

THESIS

MUNICH

1965

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO, CALIF.

Untersuchungen zur Einwirkung
von Phenylbutazon
auf die Hyaluronidaseaktivität
unter Adrenalindauerinfusion
bei adrenaletomierten Ratten

von

HANS-DIETER GENNING

München 1965



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München
(Direktor: Professor Dr. W. Seitz)

Untersuchungen zur Einwirkung von Phenylbutazon auf die
Hyaluronidaseaktivität unter Adrenalindauerinfusion bei
adrenalektomierten Ratten

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Hans-Dieter Genning

aus

Berlin

Jahr

1965

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Prof. Dr. W. Seitz
Dekan: Prof. Dr. R. Zenker
Tag der mündlichen Prüfung: 22.3.1966

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Problematik	4
Eigene Versuche	13
Methodik	13
Versuchsreihen	19
Statistische Auswertung	24
Diskussion	30
Zusammenfassung	32
Literaturverzeichnis	33

Problematik

Die Fragestellung über den Wirkungsmechanismus des hyaluronidasehemmenden Effekts entsprechend wirksamer Substanzen wie Salizylate, Phenylbutazon, Oestrone-sulfat, Chlorbenz-methoxazon, Corticoide, Moorbäder u.a. ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Um die Wirkungsweise der geprüften Substanzen näher aufzuklären, haben M a t h i e s und Mitarbeiter ¹⁻⁸ die Verhältnisse der Hyaluronidaseaktivität bei intakten, adrenalectomierten und hypophysectomierten Ratten festzustellen versucht. Dabei zeigte sich, daß die bei Normalratten hyaluronidasehemmende Wirkung z.B. des Phenylbutazons bei adrenalectomierten Ratten ausbleibt, bei hypophysectomierten Ratten dagegen erhalten bleibt. Dieses Verhalten berechtigt zu dem Schluß, daß das Vorhandensein der Nebenniere für das Zustandekommen der Hyaluronidasehemmung in vivo erforderlich ist, läßt aber offen, ob hierbei die Nebennierenrinde oder das Nebennierenmark die entscheidende Rolle spielt. Die Beantwortung dieser Frage war mittels des S a y e r s -Tests ⁹ gegeben, nach dem die Abnahme des Ascorbinsäuregehaltes der Nebennierenrinde als Ausdruck der inkretorischen Funktion der Nebennierenrinde zu werten ist. M a t h i e s ¹⁰, D o m e n - j o z ¹¹ und J u n g ¹² konnten zeigen, daß der Ascorbinsäuredepletionseffekt der in vivo hyaluronidasehemmenden Substanzen bei intakten Ratten gegeben ist, bei hypophysectomierten Ratten jedoch ausbleibt, d.h. bei intakten Ratten wird die Nebennierenrinde stimuliert, bei hypophysectomierten Tieren dagegen nicht. Da aber eine Aktivierung der Nebennierenrinde

bei hypophysektomierten Ratten nicht feststellbar ist, obwohl bei diesen eine Hyaluronidasehemmung nachgewiesen werden kann, ist eine Stimulierung der Nebennierenrinde als Voraussetzung für das Zustandekommen der Hyaluronidasehemmung auszuschließen. Demnach ist für den hyaluronidasehemmenden Effekt das Nebennierenmark vermutlich mit einer Katecholaminausschüttung verantwortlich zu machen.

Tatsächlich ergaben Versuche von Mathies⁴, 6, 7, 13, Mathies und Jankowski³ eine Bestätigung dieser Annahme, nach denen die Nebennierenmark-Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin nicht nur bei intakten, sondern auch bei adrenaletomierten Tieren eine Hyaluronidasehemmung gleicher Größenordnung hervorrufen, wie sie nach Applikation der geprüften hyaluronidasehemmenden Stoffe wie hier am Beispiel des Phenylbutazons auftritt. Dabei liegt bei der Ratte die Mindestmenge der Katecholamine, die eine Hyaluronidasehemmung ergibt, zwischen 0,5 und 1,0 Gamma/100 g Tier²².

Weitere Stützen für die Katecholaminwirkung als entscheidenden Faktor im Geschehen der Hyaluronidasehemmung lassen sich anführen.

Durch direkte Bestimmung des Katecholamingehalts der Nebenniere mittels einer chemisch-photometrischen Methode nach Brüggemann, Karg und Käppeler¹⁴ konnte Mathies¹⁰ eine Katecholaminausschüttung nach Einwirkung verschiedener hyaluronidasehemmenden Substanzen nachweisen. Entweder erfolgte die Ausschüttung auf Kosten des in der Nebenniere vorhandenen Normaldepots, oder wie beim Phenylbu-

butazon auf Grund einer vermehrten Bildung von Katecholaminen mit entsprechender Ausschüttung des Überschusses, bzw. waren beide Möglichkeiten gekoppelt, indem nach einer vorher vermehrten Bildung nicht nur der Überschuß ausgeschüttet wurde, sondern darüber hinaus der Spiegel des Normaldepots sank. Ferner heben Sympatholytika (Adrenolytika) wie Ergotamin den Effekt der Hyaluronidasehemmung nicht nur von Adrenalin und Noradrenalin selbst, sondern auch von Salizylaten, Phenylbutazon, Corticoiden, Moorbädern u.a. durch Blockierung der Katecholaminwirkung auf ⁶. Ganglioblocker dagegen blockieren nur die hyaluronidasehemmende Wirkung entsprechender Substanzen ¹⁵, jedoch nicht die des Adrenalin und Noradrenalin ¹⁶.

Auch diese Ergebnisse sprechen für einen Wirkungsablauf der hyaluronidasehemmenden Stoffe über eine Katecholaminausschüttung, und somit war zu erwarten, daß Adrenalin und Noradrenalin als Nebennieren-Katecholamine eine hyaluronidasehemmende Wirkung entfalten, während die Adrenolytika die ausgeschütteten oder parenteral zugeführten Katecholamine in ihrer Wirkung aufheben oder umkehren, im Gegensatz zu den Ganglioblockern, die wie auch schon E i c h h o l t z ¹⁷ feststellte, das Nebennierenmark als differenziertes Ganglion, also lediglich die Katecholaminausschüttung, blockieren.

Bei den Untersuchungen von S c h e u f e l e ¹⁸ ist auffällig, daß die Hyaluronidasehemmung des zugeführten Adrenalin bzw. Noradrenalin zu einem späteren Zeitpunkt auftritt, als dem der primären, an der Pupillenreaktion sichtbaren Katecholaminwirkung, und zwar nach geringeren Dosen eher als nach höheren, wohl deshalb, weil geringere Dosen eher unwirksam werden.

Nun ist auf klinischem und vor allem balneologischem Gebiet durch F e l l i n g e r und S c h m i d ^{19, 20} in Erfahrung gebracht worden, daß nach antirheumatisch wirksamen Substanzen und besonders Moorbädern eine anirheumatische Wirkung (und diese besteht zumindest zu einem Teil auf einer Hyaluronidasehemmung) erst in der vagalen Gegenregulation auf eine primäre sympathikotone Phase deutlich wird. Dieser Effekt könnte sich mit der verzögerten Katecholaminwirkung bezüglich der Hyaluronidasewirkung im Sinne einer Hemmung decken. In entsprechenden Versuchsreihen hat K r a m e r ²¹ adrenaletomierten Ratten (um reaktive Katecholaminwirkung auszuschließen) Acetylcholin mit Prostigmin als Cholinesterasehemmer appliziert. Da aber diese Parasympathomimetika an adrenaletomierten Ratten keine Hemmung sichtbar werden lassen, ist eine primär vagale Reaktionslage als Voraussetzung für eine Hyaluronidasehemmung nicht anzunehmen.

In weiteren Untersuchungen von M a t h i e s und S c h i e r f ⁷ konnten früher schon mittels der Pupillenreaktion gewonnene Ergebnisse erneut bestätigt werden; denn während einer Adrenalindauerinfusion über 2 Stunden an adrenaletomierten Ratten wurde eine Hyaluronidasehemmung erst nach gewohntem Zeitabstand nach Absetzen der Infusion deutlich. Wurden zusätzlich im Verlauf der Dauerinfusion "Adrenalinspitzen" gesetzt, so trat bereits während der Infusion im Anschluß an diese Spitzen nach deren Abklingen wiederum in gewohntem Zeitabstand eine Hemmung der Hyaluronidaseaktivität ein. Es wird demnach angenommen, daß eine Hyaluronidasehemmung immer dann manifest wird, wenn nach dem Absinken eines höheren Adrena-

linblutspiegels ein niedrigeres Niveau erreicht wird. Eine gewisse Zeitspanne bis zum Einsetzen der Adrenalinwirkung im Sinne einer Latenzzeit oder einer gegenregulatorischen vagalen Phase können, wie oben gezeigt, ausgeschlossen werden. Die bei intakten Ratten schon während der Infusion sich manifestierende Hyaluronidasehemmung beruht nach M a t h i e s²² darauf, daß eine Adrenalininjektion direkt eine zusätzliche Nebennierenmark-Hormonausschüttung bewirkt.

Nach Untersuchungen von M e c k e l²³ und E c k e l m a n n²⁴ mit Reserpin und von R e i n d l²⁵ mit Monoaminoxidaseinhibitoren besteht Grund zu der Annahme, daß auch ohne vorherige Erhöhung das Absinken des Katecholaminblutspiegels unter das physiologische Normalniveau zu einer Hyaluronidasehemmung führt. Entscheidend ist demnach nicht die absolute Höhe des betreffenden Katecholaminblutspiegels, sondern allgemein ein Absinken von einem höheren auf ein niedrigeres Niveau.

Den Versuch einer Klärung näherer Einzelheiten über den Einfluß eines Monoaminoxidasehemmstoffes auf den Wirkungsmechanismus hyaluronidasehemmender Substanzen hat sich u.a.

R e i n d l²⁵ am Beispiel des Iproniazid (Isopropyl- isonicotinsäurehydrazid, Marsilid) vorgenommen. Wie bekannt, katalysiert die Monoaminoxidase den Abbau biogener Amine, von denen Serotonin (5-Hydroxytryptamin) und die Katecholamine zu den klinisch interessantesten gehören, durch oxydative Decarboxylierung. Durch Monoaminoxidaseinhibitoren müßte es daher möglich sein, jedes beliebige Blutspiegelniveau an Adrenalin oder Noradrenalin über längere Zeit auf konstanter Höhe zu erhalten, als dies ohne Hemmung der Mono-

aminoxydase der Fall wäre, deren fermentative Wirkung sehr rasch eintritt. Voraussetzung ist die Monoaminoxydasehemmende Wirkung nicht nur im Gewebe, sondern auch in der Blutbahn. In Ergänzung zu den Versuchen von L a t h i e s und Mitarbeitern ¹⁻⁸, nach denen wie o.a. der hyaluronidasehemmende Effekt durch das Absinken des Katecholaminblutspiegels von einem höheren auf ein niedrigeres Niveau zustandekommt, bietet sich an, mittels Blockierung der Monoaminoxydase durch Verhinderung des Katecholaminabbaus, die Hyaluronidasehemmung zu verhindern oder wenigstens zu protrahieren. Diese Erwartungen erfüllten sich nach Versuchen von R e i n d l ²⁵ nicht: Iproniazid bewirkt nach 15 Minuten eine Hemmung der Hyaluronidaseaktivität. Der Versuch einer Interpretation dieses Geschehens ist im Hinblick auf bisherige pharmakologische Befunde möglich. Z e l l e r und B a r s k y ²⁶, Z b i n d e n und S t u d e r ²⁷ halten die Monoaminoxydasehemmung für eine gewebliche Reaktion, und P l e t s c h e r ²⁸ vertritt die Ansicht, daß durch Hemmung der Monoaminoxydase eine Anhäufung der Katecholamine in den Bildungsstätten erfolgt, die Freisetzung jedoch gehemmt und die Bindung an subzelluläre Strukturen verstärkt wird. Die Hyaluronidasehemmung nach Iproniazid ist also dahingehend auszulegen, daß die Freisetzung der Brenzkatechinamine aus dem Nebennierenmark in die Blutbahn gehemmt wird, woraus sekundär ein Absinken des physiologischen Blutkatecholaminspiegels unter den Normwert resultiert. Bei adrenaletomierten Ratten, bei denen von vornherein ein Blutspiegelkatecholamingehalt nicht noch weiter gesenkt werden kann, es sei denn durch eine Zurückhaltung von Katecholaminen in sonstigem chromaffinem Gewebe, ist nach Iproniazid die Hyaluro-

nidasehemmung wesentlich geringer²⁵. Auf bereits freigestztes Adrenalin oder im Versuch experimentell zugeführtes Adrenalin bzw. auf die dann zu erwartende Hyaluronidasehemmung hat Iproniazid keinen Einfluß^{25, 29}. Die nicht zu erwartende Feststellung, daß die Hyaluronidasehemmende Wirkung des Iproniazid durch Ganglienblocker oder Adrenolytika nicht aufgehoben, sondern nur abgeschwächt wird²⁵, bedarf noch einer näheren Klärung. Sie deutet lediglich darauf hin, daß die hyaluronidasehemmende Wirkung des Iproniazid nicht wie bei den anderen geprüften Substanzen über die von *Mathies* eingangs beschriebene Katecholamindynamik mit Stimulierung und vermehrter Ausschüttung der Brenzkatechinamine aus dem Nebennierenmark erfolgt. Daß aber überhaupt eine Hyaluronidasehemmung zustandekommt, kann nur durch das Absinken des Blutkatecholaminspiegels unter das Normalniveau erklärt werden.

Ähnliche Verhältnisse, wenigstens in dieser Beziehung, könnten auch beim Reserpin vorliegen. Dieses Rauwolfiaalkaloid ruft ebenfalls eine starke Hemmung der Hyaluronidaseaktivität hervor, die weder durch Ganglienblocker noch durch Adrenolytika aufzuheben ist³⁰. Reserpin wirkt also nicht über eine Katecholaminausschüttung aus dem Nebennierenmark, und das Absinken des Katecholaminblutspiegels als Voraussetzung für die Hyaluronidasehemmung kann nicht im Anschluß an eine vorherige Blutkatecholaminspiegelerhöhung erfolgt sein. Vielmehr kann man auch hier für das Zustandekommen der Hemmung der Hyaluronidaseaktivität ein Absinken des Blutkatecholaminspiegels unter das Normalniveau annehmen. Die Mehrzahl

anderer Untersucher beschreibt die Reserpinwirkung als entspeichernden Effekt der biogenen Amine ³¹⁻³⁶, wodurch auf eine zunächst mehr oder weniger sichtbare sympathikomimetische Reaktion ³⁷⁻⁴⁰ eine zentrale und periphere Verarmung der produzierenden Gewebe an Biogenen Aminen erfolgt, was letztlich für die antisymphathikotone Wirkung des Reserpins ausschlaggebend ist. Werden die Reserpindosen einschleichend appliziert, so werden aus den Speichern nur unerschwellige Mengen an Katecholaminen frei und die sympathikusblockierende Wirkung steht eindeutig im Vordergrund. Aber auch für höhere Dosen steht neben anderen Wirkungen auf das Zentralnervensystem die Blockierung des Sympathikus, sowohl zentral als auch peripher außer Zweifel. Die direkte Bestimmung des Nebennierenmark-Katecholamingehalts bei Tieren, die unter Einfluß von Reserpin stehen, ergibt keine signifikante Veränderung im Hormonhaushalt des Nebennierenmarkes ⁴¹. Die von B i e c h e l e ⁴² beobachtete vermehrte Neubildung von Brenzkatechinaminen durch Phenylbutazon mit einem Maximum nach 30 und 180 Minuten wird in der ersten Phase durch Reserpin abgeschwächt, in der zweiten ganz unterdrückt ⁴¹. Ein indirekter Einfluß von Reserpin auf die Nebenniere ist also doch zu diskutieren. Nach den Untersuchungsergebnissen von M a t h i e s, E c k e l m a n n und M e c k e l ³⁰ müssen die hier ausgeschütteten Katecholamine durch Reserpin unwirksam werden, wenn unter Phenylbutazon eine Katecholaminausschüttung vorwiegend auf Kosten einer Neubildung erfolgen soll und die zu erwartende Hyaluronidasehemmung trotzdem ausbleibt. Ähnliches gilt für die Salizylsäure, bei der eine Katecholaminausschüttung auf Kosten des Depots erfolgt, denn auch hier muß die nach Reserpin allerdings

abgeschwächte Ausschüttung durch Reserpin blockiert werden, da ebenfalls keine Hyaluronidasehemmung eintritt.

M e c k e l ²³ hat in ihren Untersuchungen die blockierende Wirkung des Reserpins auf die Hyaluronidasehemmung experimentell zugeführten Adrenalins bestätigen können. Bei aller Vielfalt der Ergebnisse, kann besonders im Hinblick auf die Untersuchungen von M a t h i e s , E c k e l m a n n und M e c k e l ³⁰ und H e i n e r i c h ⁴¹ die Hyaluronidasehemmwirkung des Reserpins auf einem Abfall des Blutkatecholaminspiegels unter das Normalniveau beruhen. Andererseits bieten sich diese Versuchsergebnisse, zusammen mit denen anderer Autoren ^{31, 35, 43}, nach denen durch Reserpin nicht nur der Katecholamingehalt der Nebenniere, sondern auch der anderer Gewebe abnimmt, für die Erklärung einer allgemeinen Katecholaminblockierung an. Eine gewöhnliche Blockierung der Adrenalinausschüttung scheidet insofern aus, als nachgewiesen werden konnte, daß Reserpin wohl zu einer Verarmung des Adrenaliningehalts des Nebennierenmarkes führt, die jedoch nicht einer Ausschüttung im Sinne einer vorübergehenden Erhöhung des Adrenalinblutspiegels entspricht ²⁴. So ist die Reserpinwirkung auch über eine periphere Sympathikusblockade zu diskutieren, die zu einer Hyaluronidasehemmung führt, trotz vermutlich gleichbleibenden Katecholaminblutspiegels. Hier drängt sich die eingangs von F e l l i n g e r und S c h m i d ^{19, 20} beschriebene Parallele auf balneologischem Gebiet auf: Auf eine sympathikotone Phase (die auch beim Reserpin mehr oder weniger latent in Erscheinung tritt), bzw. nach der Aufhebung des Sympathikotonus tritt die Hemmung der Hyaluronidaseaktivität auf. Wie sich dabei die Aufhebung der Sympathikuswir-

kung vollzieht, muß dahingestellt bleiben. (Im Falle des Reserpins beruht die Sympathikusblockade wie o.a. wohl auf dem entspeichernden Effekt.) Es kann nur weitgehend ausgeschlossen werden, daß es sich um eine antagonistische vagale Tonicisierung handeln könnte ²¹. Die eingangs von M a t h i e s formulierten Ergebnisse, nach denen eine Hyaluronidasehemmung durch Senkung des Blutkatecholaminspiegels zustandekommt, können als gesichert gelten. Sie wären nur dahingehend zu interpretieren, daß der Abfall des Blutkatecholaminspiegels gleichbedeutend mit dem Effekt einer Sympathikushemmung ist, die als wichtiger Schritt in der "Gegenregulationsphase" für die Hyaluronidasehemmung erforderlich ist.

Unter diesem Gesichtspunkt ist zu prüfen, ob bei adrenalektomierten Ratten unter Adrenalinlängerinfusion über längere Zeit nach Phenylbutazon eine Hyaluronidasehemmung schon während der Infusion, also ohne Absinken des Blutkatecholaminspiegels in Erscheinung tritt. Mit dieser Versuchsanordnung kann festgestellt werden, ob Phenylbutazon möglicherweise auch direkt oder indirekt einen peripher sympathikusblockierenden Effekt, ähnlich dem des Reserpins haben kann.

Eigene Versuche

Methodik

Sämtliche Versuche wurden an adrenalektomierten Ratten durchgeführt. Es wurden männliche weiße Ratten mit einem Gewicht von 180 bis 240 g verwendet. Die Durchführung der Versuche erfolgte unter kombinierter Evipan-Luminal-Narkose, wobei pro 100 g Tiergewicht 20 mg Evipan und 8,8 mg Luminal s.c. inji-

ziert wurden. Ein Einfluß von Barbituraten auf die Aktivität der Hyaluronidase besteht nach W i l h e l m i ⁴⁷ nicht.

Obwohl sich männliche und weibliche Ratten in gleicher Weise für die Versuche eignen, wurden die männlichen lediglich aus anatomischen Gründen bevorzugt, weil die Enthaarung ihrer glatten Bauchhaut leichter zu handhaben ist und hierbei Verletzungen der Epidermis vermieden werden können. Um etwaige Einflüsse der jeweiligen Lokalisationen bei der noch zu beschreibenden Quaddelmethode auf die Ergebnisse der Versuche auszuschalten, wurde die Bauchhaut der Tiere als ein Versuchsfeld mit 6 verschiedenen Lokalisationen aufgefaßt und das Setzen der Quaddeln nach dem "lateinischen Quadrat" variiert. Durch die begrenzte Größe des Rattenbauches ist ein Variieren der verschiedenen zu setzenden Quaddeln auf nur 6 Lokalisationen beschränkt. Zu einer Versuchsreihe gehören entsprechend den 6 Lokalisationen 6 Tiere. Innerhalb dieser 6 Tiere wird jede der pro Tier möglichen Lokalisationen einmal in Anspruch genommen, sodaß eine bestimmte Quaddel bei jedem der 6 Tiere an anderer Stelle auftritt und die ganze Reihe durchläuft.

Die Hyaluronidasehemmung wurde durch einen auf dem Spreadingeffekt beruhenden Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddeltest festgestellt, wobei die Ausbreitung einer Farbstoff- bzw. einer Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel vor und zu bestimmten Zeiten während und nach der Adrenalindauerinfusion ermittelt wurden. Die Quaddeln wurden streng intracutan mit dünner Kanüle (Nr.20) in die mit Pilca enthaarte Bauchhaut gesetzt. Im Hinblick auf die Genauigkeit der zu applizierenden Menge wurden die Injektionen mit einer 1 ml Tuberculinspritze vorgenommen. Die reine Farbstoffquaddel wurde mit 0,1 ml einer 0,06 %igen Evans-

blaulösung gesetzt. Stärkere Farbstoffkonzentrationen bedingten eine in zu engen Grenzen verbleibende Ausbreitung der Quaddel, bei schwächeren Lösungen waren der Kontrast zu rötlichen Bauchhaut und somit die Genauigkeit der Ablesung ungenügend. Zur Herstellung der Farbstoff-Hyaluronidase-Lösung wurde der Inhalt einer Trockenampulle Hyaluronidase (Kinetin) mit 150 IE in 2ml der oben genannten 0,06 %igen Evansblaulösung gelöst, sodaß bei der Injektion von 0,1 ml 7,5 IE zu Wirkung kamen. 10 Minuten nach Setzen des Quaddelpaares (Farbstoffquaddel sowie Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel) wurden dessen Diffusionsgeschwindigkeit an der erreichten Ausbreitung registriert, indem die Konturen, mittels eines Blaustifts verdeutlicht, auf einen Celluloidstreifen kopiert und planimetrisch ausgemessen wurden. Die Zahlenangaben über die Quaddelgröße verstehen sich in mm^2 . Nach M a d i n a v e i t i a⁴⁵ verläuft das Spreading in 2 Phasen, bei welchen nur die erste, innerhalb 10 Minuten ablaufende Reaktion ein echter Effekt der Hyaluronidase ist. Nach Ablauf der ersten 10 Minuten dürften dann Resorptionsmechanismen im Vordergrund stehen. Nach G i b b i a n⁴⁶ beruht die aktive Diffusion einer intracutan gesetzten Quaddel auf dem Druck, den das Flüssigkeitsdepot auf seine Umgebung ausübt. Dabei wird durch Hyaluronidase der Widerstand der Umgebung herabgesetzt. Naturgemäß zeigt die Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel wegen der durch die Hyaluronidase bedingten höheren Gewebspermeabilität eine weit raschere Ausbreitung als die reine Farbstoffquaddel; dagegen weist die Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel eine gewisse Hemmung der Ausbreitung auf, wenn eine hyaluronidasehemmende Substanz vorher

appliziert wird. An Hand dieser sichtbaren Reaktion wird die Hemmung der Hyaluronidase errechnet.

Bei der Adrenalektomie in Evipannarkose (30 mg/100 g Tiergewicht s.c.) wurden die Nebennieren von dorsal angegangen. Es braucht hierbei nicht steril gearbeitet zu werden, noch ist für saubere, lückenlose Naht zu sorgen, um die Vitalität der Versuchstiere für die Zeit der Versuche zu erhalten. Anschließend wurden die Tiere kohlenhydratreich (Haferflocken und Zucker) ernährt und erhielten zur Aufrechterhaltung des Ionenhaushaltes physiologische NaCl-Lösung. Die Tiere wurden 48 Stunden nach der Operation in Versuch genommen, da nach Untersuchungen von K a r g ⁴⁷ auf Grund von Messungen des Nebennierenbedingten Grundumsatzes und der Ergebnisse des Thorn-Tests in dieser Zeit eine Regeneration von funktionstüchtigem akzessorischen Nebennierengewebe kaum zu befürchten ist. Innerhalb von 2-4 Tagen nach der Adrenalektomie ist der Corticoidgehalt des Blutes abgesunken, der Grundumsatz zeigt sein Minimum, und der Thorn-Test ist negativ, ein Wiederanstieg durch etwa regeneriertes akzessorisches Nebennieren-Gewebes tritt erst nach dieser Zeit in Erscheinung. Nach B a c h - m a n n ⁴⁸ zeigen 8 % der normalen Ratten mikroskopisch feststellbare akzessorische Nindenknötchen unterschiedlicher Lokalisation, dagegen längere Zeit nach Adrenalektomie 25-70 %. C a n a l i s ⁴⁹ sah bei Hunden und Katzen erst 2 Tage nach Teiladrenalektomie die erste Zunahme der Mitosen.

Die Adrenalindauerinfusion wurde i.v. in die freigelegte Femoralvene durch eine mittels eines dünnen Schlauches an eine fixierte Tuberculinspritze angeschlossene Kanüle (Nr.20) in-

jiziert. Die verwendete Adrenalinlösung enthielt 0,5 Gamma in 0,05 ml physiologischer Kochsalzlösung. Während der Dauerinfusion wurde besonders darauf geachtet, daß die pro Zeiteinheit zu infundierende Menge gleichmäßig und kontinuierlich verabfolgt wurde, um das Setzen von Spitzen zu vermeiden. Bei sämtlichen Versuchen wurde in der ersten Minute 1 Gamma, darauf für jede weitere Minute 0,5 Gamma Adrenalin wie beschrieben, infundiert.

I. Versuchsreihe (reine Adrenalindauerinfusion)

1. Gruppe

In jeder Gruppe wurde den adrenaletomierten Ratten vor dem eigentlichen Versuch eine reine Farbstoff- und eine Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel gesetzt und deren Ausbreitung nach 10 Minuten bestimmt. Danach Anlegen einer Adrenalindauerinfusion über 55 Minuten. 15 und 45 Minuten nach Infusionsbeginn Setzen eines Farbstoff- und Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddelpaares, das jeweils 10 minuten später abgelesen wird, also 25 bzw. 55 Minuten nach Infusionsbeginn.

2. Gruppe

Versuchsanordnung wie in erster Gruppe, jedoch mit verlängerter Infusion über 90 Minuten. 75 und 90 Minuten nach Infusionsbeginn Setzen eines Farbstoff- und Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddelpaares, das wiederum jeweils 10 Minuten nach dem Setzen abgelesen wird.

3. Gruppe

Versuchsanordnung wie bei zweiter Gruppe, jedoch Setzen des Quaddelpaares 15 Minuten nach Absetzen der Infusion (= 105 Minuten nach Infusionsbeginn) und 30 Minuten nach Absetzen der Infusion (= 120 Minuten nach Infusionsbeg.).

II. Versuchsreihe (Adrenalindauerinf. + Phenylbutazon)

1, 2. und 3. Gruppe wie in I. Versuchsreihe, jedoch mit intraperitonealer Applikation von 10 mg Phenylbutazon pro 100 g Tiergewicht in seitliche Leistenbeuge, jeweils 10 Minuten nach Infusionsbeginn.

I. Versuchsreihe (reine Adrenalindauerinfusion)

1. Gruppe

Tier Nr.	Tier- gewicht in g	Farbstoff-Quaddel			Farbstoff-Hyasequaddel		
		vor mm ²	15' nach mm ²	45' nach mm ²	vor mm ²	15' nach mm ²	45' nach mm ²
1	180	115	120	119	180	170	170
2	200	112	110	100	150	160	110
3	190	95	95	93	180	170	205
4	220	135	120	122	165	195	160
5	200	130	125	120	200	175	192
6	210	122	110	130	160	165	160

2. Gruppe

Tier Nr.	Tier- gewicht in g	Farbstoff-Quaddel			Farbstoff-Hyasequaddel		
		vor mm ²	75' nach mm ²	90' nach mm ²	vor mm ²	75' nach mm ²	90' nach mm ²
1	215	150	175	155	202	230	210
2	200	146	122	148	200	185	178
3	210	145	150	140	190	210	220
4	200	192	186	175	240	242	248
5	220	139	145	140	195	200	174
6	190	132	145	150	180	218	200

I. Versuchsreihe

3. Gruppe (Infusion wurde nach 90 min abgesetzt)

Tier Nr.	Tier- gewicht in g	Farbstoff-Quaddel			Farbstoff-Hyasequaddel		
		vor mm ²	105' mm ²	120' mm ²	vor mm ²	105' mm ²	120' mm ²
1	220	151	157	130	193	170	125
2	225	142	130	121	201	152	145
3	220	144	130	132	178	198	198
4	250	170	148	146	215	164	157
5	190	137	130	132	181	169	132
6	210	121	112	110	184	158	125

II. Versuchsreihe (Adrenalindauerinfusion und Phenylbutazon)

1. Gruppe

Tier Nr.	Tier- gewicht in g	Farbstoff-Quaddel			Farbstoff-Hyasequaddel		
		vor mm ²	15' nach mm ²	45' nach mm ²	vor mm ²	15' nach mm ²	45' nach mm ²
1	220	130	125	132	198	180	176
2	230	132	119	120	180	167	164
3	190	134	148	119	185	186	180
4	195	128	132	136	191	186	190
5	210	120	140	132	176	175	175
6	225	130	135	148	200	198	210

II. Versuchsreihe

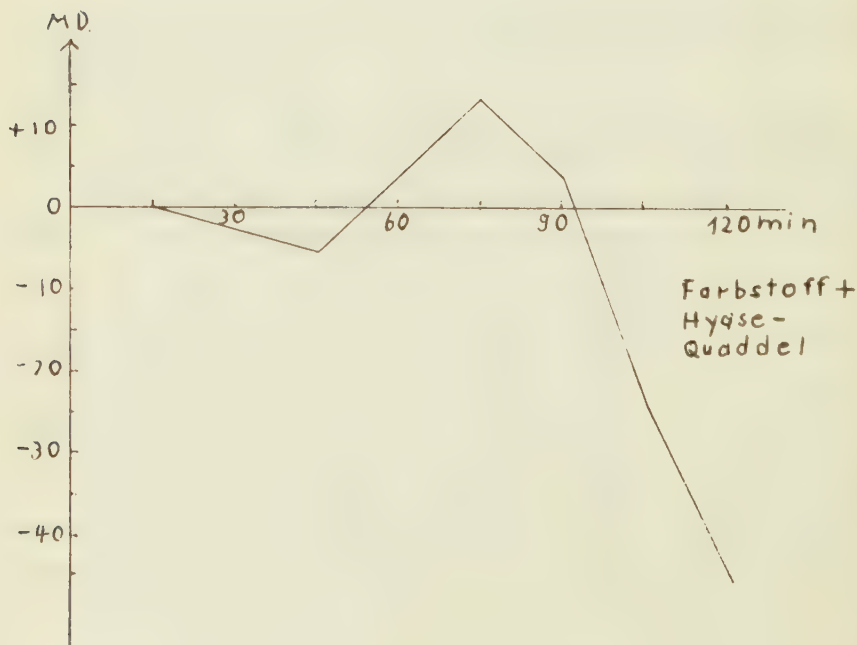
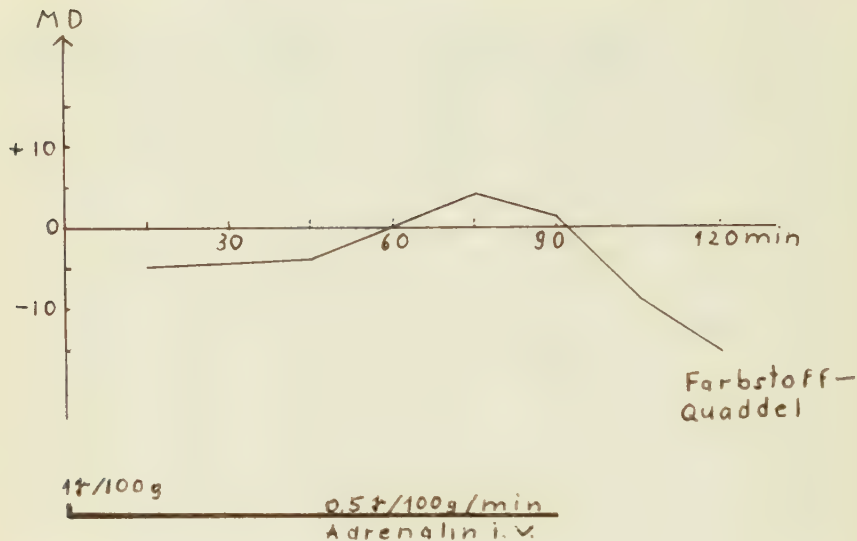
2. Gruppe

Tier Nr.	Tier- gewicht in g	Farbstoff-Quaddel			Farbstoff-Hyasequaddel		
		vor mm ²	75' nach mm ²	90' nach mm ²	vor mm ²	75' nach mm ²	90' nach mm ²
1	230	131	119	117	219	214	223
2	240	139	121	128	194	189	169
3	205	112	134	135	209	202	209
4	215	110	120	104	185	187	205
5	180	127	123	124	198	200	189
6	225	115	120	125	203	209	211

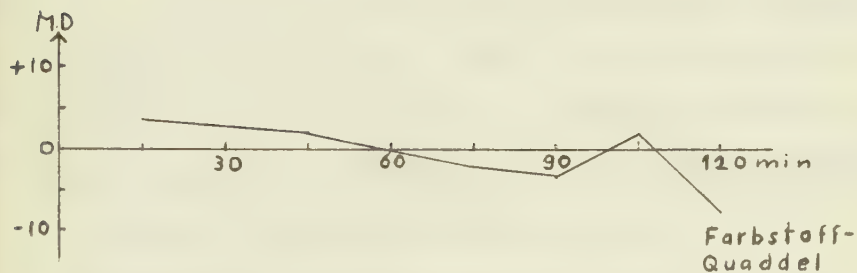
3. Gruppe (Infusion wurde nach 90 min abgesetzt)

Tier Nr.	Tier- gewicht in g	Farbstoff-Quaddel			Farbstoff-Hyasequaddel		
		vor mm ²	105' nach mm ²	120' nach mm ²	vor mm ²	105' nach mm ²	120' nach mm ²
1	205	145	148	137	226	198	190
2	210	155	156	135	249	215	160
3	240	129	134	130	200	187	142
4	230	152	137	125	250	200	178
5	205	112	128	121	207	204	192
6	220	129	132	125	211	196	182

Graphische Darstellung der Versuchsergebnisse der
Versuchsreihe I



Graphische Darstellung der Versuchsergebnisse der
Versuchsreihe II



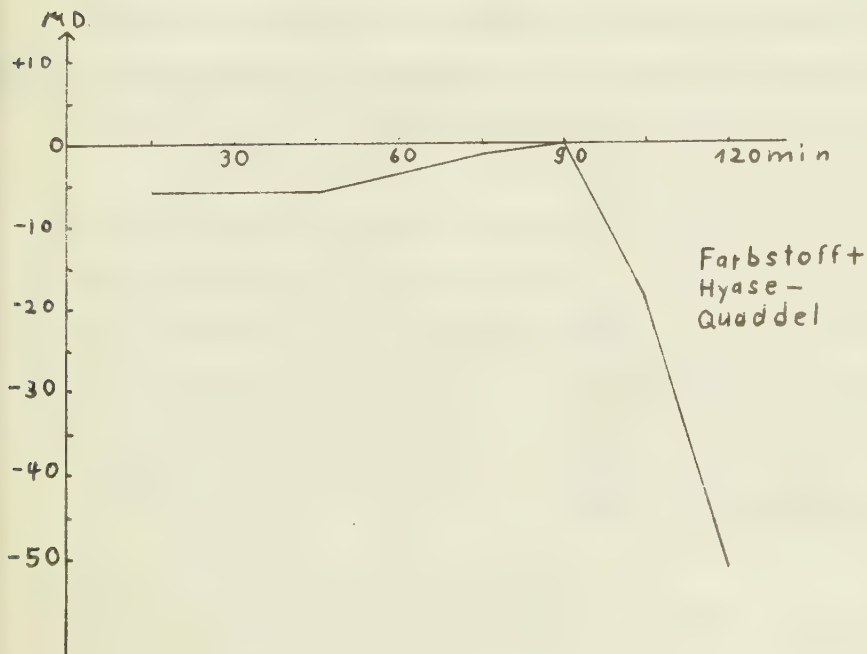
1 r/100 g

0,5 r/100 g/min

Adrenalin i.V.

↑

10 mg/100 g Phenylbutazon



Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse

1. Mathematisch statistische Methodik

Die vorliegenden Meßreihen werden zunächst durch die statistischen Maßzahlen Mittelwert $\bar{x}$ und mittlere quadratische Abweichung (m.q.A.) $s_{\bar{x}}$ beschrieben. Für die Prüfung von Unterschieden sind die Einflüsse versuchsbedingter Variabilitäten zu berücksichtigen. In einer zweifachen Varianzanalyse läßt sich die Gesamtvarianz nach drei Komponenten hin trennen und damit unter Berücksichtigung des Einflusses der Variabilität zwischen den Tieren und der Komponente zwischen den Stufen eine Restvarianz finden, die als methodische Variabilität bezeichnet werden kann. Aus ihrem Verhältnis zur Komponente zwischen den Beobachtungsstufen ist mittels des Quotiententests ($F_{\text{emp.}}$) nach Fisher auf tatsächlich bestehende Unterschiede zwischen den Beobachtungen verschiedener Zeiten zu schließen, soweit die zugelassene Irrtumswahrscheinlichkeit $p = 0.05$ in der zugehörigen F-Prüfverteilung nicht überschritten wird.

Als Ergebnisse der mathematisch statistischen Analyse sind die Freiheitsgrade FG der Varianzkomponente, Summenabstandsquadrate SAQ und Mittlere Abstandsquadrate MAQ, die Varianzquotienten $F_{\text{emp.}}$ zwischen jeweiliger Komponente und Restvarianz, sowie die Irrtumswahrscheinlichkeit p angegeben, die ein Maß der Sicherheit für die getroffene Entscheidung (Differenz der Mittelwerte $\bar{x}_d \neq 0$) darstellt.

Die Ausbreitung der Quaddeln in % bezieht sich auf die beobachteten zugehörigen Kontrollwerte (100%).

er- uchs- eihe	An- zahl der beob. Tiere	Zeit t nach Infus. Beginn (min)	<u>Farbstoff-Quaddeln</u>			<u>Farbstoffhyal.-Quaddeln</u>		
			Mittel	m.q.A.	Ausbr./	Mittel	m.q.A.	Ausbr./
			$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	Hemmg.	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	Hemmg.
					+ (%)			+ (%)

abelle 1: Kontrollwerte K und Meßwerte der Farbstoffausbreitung unter Adrenalindauerinfusion

. 1.Gr. 6	K	118.1	5,8		172.5	7.2	
	. 15'	113.3	4.4	-4	172.5	4.9	0
	. 45'	114.0	5.8	-3	166.1	13.4	-3
2.Gr. 6	K	150.6	8.6		201.1	8.4	
	. 75'	153.8	7.6	+2	214.1	7.9	<u>+6</u>
	. 90'	151.3	5.3	0	205.0	11.2	<u>+2</u>
3.Gr. 6	K	144.1	6.6		192.0	5.7	
	. 105'	134.5	6.4	<u>-7</u>	168.5	6.5	<u>-12</u>
	. 120'	128,5	4.9	<u>-11</u>	147.0	11.4	<u>-23</u>

abelle 2: Kontrollwerte K und Meßwerte der Farbstoffausbreitung unter Adrenalindauerinfusion und Applikation von Phenylbutazon

. 1.Gr. 6	K	129.0	1.9		188.3	3.9	
	. 15'	133.1	4.2	+3	182.0	4.4	-3
	. 45'	131.1	4.4	+2	182.5	6.4	-3
2.Gr. 6	K	122.3	4.7		201.3	4.8	
	. 75'	122.8	2.3	0	200.1	4.3	0
	. 90'	122.1	4.3	0	201.0	7.8	0
3.Gr. 6	K	137.0	6.7		223.8	8.8	
	. 105'	139.1	4.3	+1	200.0	3.7	<u>-10</u>
	. 120'	128.8	2.5	-6	174.0	7.9	<u>-22</u>

2. Ergebnisse der experimentellen Untersuchungen

1. In den Tabellen 1 und 2 sind die Meßergebnisse der experimentellen Untersuchungen durch Mittelwerte $\bar{x}$ und mittlere quadratische Abweichungen (m.q.A.) $s_{\bar{x}}$ beschrieben und die Meßwerte der Farbstoffausbreitung bezüglich ihrer Kontrollen K in % angegeben.

2. Analyse und Interpretation der Testergebnisse

Versuchsreihe I, 1. - 3. Gr.

zur Hyaluronidaseaktivität unter Adrenalin.

Ohne weitere Beeinflussung zeigen die Farbstoffhyaluronidasequaddeln gegenüber den bloßen Farbstoffquaddeln im beobachteten Zeitraum eine sehr deutliche Vergrößerung ($p < 0.001$) um mittlere 6% der Flächeneinheiten mit einem maximalen Wert 75 min nach Beginn der Adrenalindauerinfusion. Diese Quaddelausbreitung kehrt sich im später beobachteten Zeitraum von 105 bis 120 min nach Beginn der Dauerinfusion in eine deutliche Verkleinerung ($p < 0.01$) um maximal mittlere 23% gegenüber Kontrollwerten vor Infusion von Adrenalin, die jedoch in geringerem Maß mit maximal mittleren 11% und mit Sicherheit ($p < 0.05$) auch an den bloßen Farbstoffquaddeln festzustellen ist.

Tabelle 3:

Varianzanalysen zur Versuchsreihe I

Beob.zeiten in min	Varianz- komponente	FG	SAQ	MAQ	F _{emp.}	P
<u>Farbstoffquaddeln</u>						
I: 1.Gr. K-15'-45'	gesamt	17	2707	-	-	-
	zw.Tieren	5	2222	444.4	11.02	<0.001
	zw.Stufen	2	82	41.	1.01	>0.05
	Rest	10	403	40.3	-	-
2.Gr. K-75'-90'	gesamt	17	5791	-	-	-
	zw.Tieren	5	4630	926.	8.22	<0.01
	zw.Stufen	2	33	16.5	0.14	>0.05
	Rest	10	1128	112.8	-	-
3.Gr. K-105'-120'	gesamt	17	4044	-	-	-
	zw.Tieren	5	2856	571.2	13.04	<0.001
	zw.Stufen	2	750	325.	7.40	<0.05
	Rest	10	438	43.8	-	-
<u>Farbstoffhyaluronidasequaddeln</u>						
I: 1.Gr. K-15'-45'	gesamt	17	7908	-	-	-
	zw.Tieren	5	4732	946.4	3.49	<0.05
	zw.Stufen	2	462	231.	0.85	>0.05
	Rest	10	2714	271.4	-	-
2.Gr. K-75'-90'	gesamt	17	8580	-	-	-
	zw.Tieren	5	6306	1061.2	20.85	<0.001
	zw.Stufen	2	1766	883.	17.39	<0.001
	Rest	10	508	50.8	-	-
3.Gr. K-105'-120'	gesamt	17	12245	-	-	-
	zw.Tieren	5	2665	533.	0.86	>0.05
	zw.Stufen	2	6079	3037.5	8.66	<0.01
	Rest	10	3501	350.1	-	-

Versuchsreihe II, 1. - 3. Gr.

zum Einfluß von Phenylbutazon unter Adrenalin.

Die Beobachtungen dieser Versuchsreihe II weisen nur für die Farbstoffhyaluronidasequaddeln im Zeitraum 105 bis 120 min nach Beginn der Adrenalininfusion mit maximal 22% eine Verkleinerung sicher nach ($p = 0.001$).

Es ist somit der Substanz ein Einfluß auf die schon in der Versuchsreihe I beobachtete Verkleinerung der Farbstoffhyaluronidasequaddeln im beobachteten Zeitraum 105 bis 120 min abzusprechen.

Tabelle 4:

Varianzanalysen zur Versuchsreihe II

Beob.zeiten in min	Varianz- komponente	FG	SAQ	MAQ	F _{emp.}	P
<u>Farbstoffquaddeln</u>						
II: 1.Gr. K-15'-45'	<u>gesamt</u>	17	1290	-	-	-
	zw.Tieren	5	331	66.2	0.73	>0.05
	<u>zw.Stufen</u>	2	52	26.	0.28	>0.05
	Rest	10	907	90.7	-	-
2.Gr. K-75'-90'	<u>gesamt</u>	17	2415	-	-	-
	zw.Tieren	5	608	121.6	0.67	>0.05
	<u>zw.Stufen</u>	2	2	1.	0.01	>0.05
	Rest	10	1805	180.5	-	-
3.Gr. K-105'-120'	<u>gesamt</u>	17	2488	-	-	-
	zw.Tieren	5	1616	323.2	6.26	<0.01
	<u>zw.Stufen</u>	2	356	178.	3.45	>0.05
	Rest	10	516	51.6	-	-
<u>Farbstoffhyaluronidasequaddeln</u>						
II: 1.Gr. K-15'-45'	<u>gesamt</u>	17	2444	-	-	-
	zw.Tieren	5	1906	381.2	9.80	<0.01
	<u>zw.Stufen</u>	2	149	74.5	1.92	>0.05
	Rest	10	389	38.9	-	-
2.Gr. K-75'-90'	<u>gesamt</u>	17	3113	-	-	-
	zw.Tieren	5	2343	468.6	6.12	<0.01
	<u>zw.Stufen</u>	2	4	2	0.02	>0.05
	Rest	10	766	76.6	-	-
3.Gr. K-105'-120'	<u>gesamt</u>	17	12104	-	-	-
	zw.Tieren	5	2233	446.6	1.85	>0.05
	<u>zw.Stufen</u>	2	7455	3727.5	14.82	=0.001
	Rest	10	2416	241.6	-	-

D i s k u s s i o n

Die Versuchsergebnisse bestätigen zunächst die von M a t h i e s und S c h l i e r f ⁷ getroffene Feststellung, daß während einer Adrenalindauerinfusion bei adrenaletomierten Tieren keine Hemmung der Hyaluronidaseaktivität sichtbar wird. Diese tritt vielmehr erst nach Absetzen der Adrenalinapplikation auf. Die Hyaluronidasehemmung war 15 Minuten nach Absetzen der Adrenalinzufuhr mit einer Mittelwertdifferenz gegenüber dem Ausgangswert von -24 mm^2 bereits deutlich, zeigte jedoch 30 Minuten nach Absetzen mit -45 mm^2 ein noch weit größeres Ausmaß. Diese Versuchsergebnisse zeigen gleichzeitig, daß eine Kreislauf- oder Gefäßwirkung des Adrenalins im Hinblick auf die Hemmung der durch Hyaluronidase gesteigerten Farbstoffausbreitung nicht vorliegen kann, wie sie V o g e l und Mitarbeiter⁵⁰ annehmen, da während der 1 1/2 stündigen Adrenalinzufuhr zweifellos der genannte Gefäßeffekt zur Auswirkung kommen müßte. Wie bei einer einmaligen Adrenalinapplikation, so zeigte sich auch bei der Versuchsanordnung der Adrenalindauerinfusion erst nach Absinken des zunächst erhöhten Katecholaminblutspiegels die Hemmung der Hyaluronidaseaktivität.

Die gewählte Versuchsanordnung gestattet gleichzeitig, den Einfluß des Phenylbutazons auf die Hyaluronidaseaktivität bei fehlendem Nebennierenmark, jedoch bei Substitution durch experimentelle Adrenalinzufuhr, zu erforschen. Es wurde einleitend bereits erwähnt, daß nicht nur ein Absinken des Katecholaminblutspiegels, sondern auch eine periphere Sympathikus-

blockade, wie Untersuchungen mit Reserpin zeigten, eine Hyaluronidasehemmung bewirken. Letztere hat in der Peripherie anscheinend die gleiche Wirkung wie ein Abfall des Katecholaminblutspiegels. Bei adrenalektomierten Tieren ist eine über das Nebennierenmark laufende Wirkung durch Erhöhung des Katecholaminblutspiegels unter Einfluß des Phenylbutazons mit anschließendem Abfall der Blutkatecholaminwerte ausgeschlossen. Durch Substitution mittels der genannten Adrenalindauerinfusion wird ein gleichmäßiger Katecholaminblutspiegel erzielt, wobei die periphere Auswirkung einer Sympathikusblockade eine Hemmung der Hyaluronidaseaktivität sichtbar werden lassen müßte, wie sie durch Gabe von Reserpin bei adrenalektomierten Tieren unter einer Adrenalindauerinfusion auftrat. Unsere Versuchsergebnisse haben gezeigt, daß Phenylbutazon während einer Adrenalindauerinfusion bei adrenalektomierten Tieren nicht wirksam ist. Erst nach Absetzen der Adrenalindauerinfusion zeigte sich auch im Falle der Gabe von Phenylbutazon eine Hemmung der Hyaluronidaseaktivität. Es handelt sich hier um den gleichen Effekt, wie er nach Absetzen der Adrenalindauerinfusion ohne Phenylbutazongabe beobachtet wurde. Ein Effekt des Phenylbutazons wäre zu einem früheren Zeitpunkt schon während der Adrenalinapplikation zu erwarten gewesen, da die maximale Hyaluronidasehemmung durch eine alleinige Phenylbutazoninjektion nach den Untersuchungen von Mathies, Biechle und Hartmann¹ bereits 60 min p.i. vorliegt. Zu diesem Zeitpunkt trat in unseren Untersuchungen unter einer Adrenalindauerinfusion keinerlei Hemmung der Hyaluronidaseaktivität auf.

Zusammenfassung

Mittels eines Spreading-Tests zur Bestimmung der Hyaluronidasehemmung, hervorgerufen durch einen Abfall des Katecholaminblutspiegels oder eine periphere Sympathikusblockade, konnte ein evtl. peripher sympathikusblockierender Effekt des Phenylbutazons untersucht werden. Bei adrenaletomierten Ratten wird durch Substitution mittels einer Adrenalin-dauerinfusion ein gleichmäßiger Katecholaminblutspiegel erzielt, wobei die periphere Auswirkung einer Sympathikusblockade, ähnlich der des Reserpins, zu einer Hemmung der Hyaluronidaseaktivität führen müßte. Unsere Versuchsergebnisse erwiesen, daß ein peripher sympathikushemmender Effekt für Phenylbutazon nicht anzunehmen ist, da dieses während einer Adrenalin-dauerinfusion bei adrenaletomierten Tieren nicht wirksam ist. Erst nach Absetzen der Adrenalin-dauerinfusion zeigte sich im Falle der Gabe von Phenylbutazon eine Hemmung der Hyaluronidaseaktivität, ein Effekt, der auch nach Absetzen der Adrenalin-dauerinfusion ohne Phenylbutazongabe beobachtet wurde und lediglich auf dem Abfall des Katecholaminblutspiegels beruht.

Literaturverzeichnis

- 1 Mathies H., Biechele I. und Hartmann M.: Ärztl. Forsch.
14, I/160 (1960)
- 2 Mathies H. und Scholze H.: Arzneimittelfrsch. 12, 79 (1962)
- 3 Mathies H. und Jankowski A.: Klin. Wschr. 35, 892 (1957)
- 4 Mathies H.: Ärztl. Forschung 12, I/87 (1958)
- 5 Mathies H.: Arch. intern. Pharmacodyn. et Ther., im Druck
- 6 Mathies H., Glück A., Poulantzas J. und Schmidt D.:
Med. exp. 1, 64 (1959)
- 7 Mathies H. und Schlierf G.: Med. exp. 2, 334 (1960)
- 8 Mathies H.: Pharmazie 14, 429 (1959)
- 9 Sayers G. und Sayers M.: Endocrinologie 40, 256 (1947)
- 10 Mathies H.: Zschr. Rheumaforsch. 18, 208 (1959)
- 11 Domenjoz R.: Arch. exper. Path. und Pharmacol. 225,
14 (1955)
- 12 Jung M.: Diss. München (1960)
- 13 Mathies H.: Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 64, 617 (1958)
- 14 Brüggemann J., Karg H. und Käppeler O.: Vitamine und Hormone 7, 200 (1956)
- 15 Schwalbach K.: Diss. München (1959)
- 16 Oestreich G.: Diss. München (1960)
- 17 Eichholtz F.: Lehrb. d. Pharmacol., Springer Berlin-Göttingen-Heidelberg 80 (1957)
- 18 Scheufele R.: Diss. München (1958)
- 19 Fellinger K./ Schmid J.: Med. Klin. 48, 949 (1953)
- 20 Fellinger K./ Schmid J.: Münch. med. Wschr. 97, 524 (1955)

- 21 Kramer H. J.: Diss. München (1959)
- 22 Mathies H.: Arch. int. Pharmacodyn. CXXIII, 334 (1960)
- 23 Meckel E.: Diss. München (1961)
- 24 Eckelmann R.: Diss. München (1961)
- 25 Reindl W.: Diss. München (1960)
- 26 Zeller E. und Barsky J.: Proc. Soc. exp. Biol. 81,
459-61 (1952)
- 27 Zbinden G. und Studer A.: Experientia XIV, 6 201-03 (1958)
- 28 Pletscher A.: Experientia 14, 73 (1958)
- 29 Holtz P. und Balzer H.: Arch. exp. Pathol. und Pharmacol.
231,4, 333-48 (1957)
- 30 Mathies H., Eckelmann R. und Meckel E.: in Vorber.
- 31 Holzbauer M. und Vogt M. J.: Neurochem. 1, 8 (1956)
- 32 Carlsson A. und Hillarp N. A.: Kgl. fysiogr. Sällsk. Lund
Förh. 26 Nr. 8 (1956)
- 33 Kroneberg G. und Schümann H. J.: Naunyn-Schmiedeberg's
Arch. exp. Path. Pharmacol. 232, 278 (1957)
- 34 Kroneberg G. und Schümann H. J.: Arzneimittelforsch.
7, 279 (1957)
- 35 Takemoto Y., Shore J. A., Tomich E. G., Kuntzmann R. und
Brodie B. B.: J. Pharmacol. exp. Ther. 119, 188 (1957)
- 36 Muscholl E. und Vogt M.: Brit. J. pharmacol 12, 532 (1957)
- 37 Jongh D. K. de und van Broosdij-Hartzema: Acta physiol.
pharmacol. neerl. 4, 175 (1955)
- 38 Schneider J. A. und Rinehart R. K.: Arch. int. Pharma-
codyn. 105, 253 (1956)
- 39 Maxwell R. A., Ross S. D., Plummer A. J. und Sigg E. B.:
J. Pharmacol. exp. Ther. 119, 69 (1957)

- 40 Muscholl E.: Klin. Wschr. 37, 217 (1959)
- 41 Heinerich K.: Diss. München (1959)
- 42 Biechele I.: Diss. München (1959)
- 43 Bertler A., Carlsson A. und Rosegren E.: Naturwissenschaften 43, 521 (1956)
- 44 Wilhelmi G.: zit. Domenjoz (11)
- 45 Madinaveitia I.: Biochem. J. 32, 1806 (1938)
- 46 Gibian H.: Erg. d. Enzymforsch. 13, 1 (1954)
- 47 Karg H.: persönliche Mitteilung
- 48 Bachmann R.: Handbuch der mikroskopischen Anat. des Menschen VI/5 (1954) 222 ff., Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg
- 49 Canalis P.: Intern. Mschr. Anat. 4 (1887a), 312 zit.
Bachmann (48)
- 50 Vogel G., Uebel H. und Marek M. L.: Zeitschr. für ges. exp. Med. 134, 1 (1960)

Herrn Professor Dr. W. Seitz danke ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas und Herrn Dr. H. Mathies für Anregungen und Ratschläge bei der Durchführung und Gestaltung der Arbeit. Ebenfalls danken möchte ich Herrn W.J. Ziegler für die Beratung in der statistischen Auswertung der Versuchsergebnisse.

Lebenslauf

Als zweiter von zwei Söhnen des Tierarztes Dr. W. Genning und seiner Ehefrau Charlotte, geb. Martin, wurde ich am 7. Februar 1940 in Berlin geboren.

Nach vier Klassen Volksschule in Pforzheim trat ich 1950 in das dortige Realgymnasium ein. Von 1952 bis zur Ablegung der Reifeprüfung 1960 besuchte ich das Mathematisch-Naturwissenschaftliche Gymnasium in Ehingen/Do.

Im Sommersemester 1960 begann ich das Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität in München, wo ich im Herbst 1962 die ärztliche Vorprüfung bestand. Meine klinischen Semester belegte ich bis auf das zweite, das mich an die Universität in Hamburg führte, ebenfalls in München und werde im Herbst 1965 mit meinem Staatsexamen beginnen.

